

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2003 年 2 月 27 日 (27.02.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/016544 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 7/42, A61K 31/192, A61P 1/04, 1/12, 1/14, 19/08
- (21) 国際出願番号: PCT/JP02/08010
- (22) 国際出願日: 2002 年 8 月 6 日 (06.08.2002)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2001-244475 2001 年 8 月 10 日 (10.08.2001) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治乳業株式会社 (MEIJI DAIRIES CORPORATION) [JP/JP]; 〒136-8908 東京都江東区新砂 1 丁目 2 番 10 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 佐藤 吉朗 (SATO, Yoshiro) [JP/JP]; 〒250-0862 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品開発研究所内 Kanagawa (JP). 牧野 聖也 (MAKINO, Seiya) [JP/JP]; 〒250-0862 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内 Kanagawa (JP). 依田 伸生 (YODA, Nobuo) [JP/JP]; 〒189-0013 東京都東村山

市栄町 1 丁目 2 1-3 明治乳業株式会社食品機能研究所内 Tokyo (JP). 伊澤 佳久平 (ISAWA, Kakuhei) [JP/JP]; 〒189-0013 東京都東村山市栄町 1 丁目 2 1-3 明治乳業株式会社食品機能研究所内 Tokyo (JP). 神山 智敬 (KAMIYAMA, Tomonori) [JP/JP]; 〒250-0862 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内 Kanagawa (JP). 北條 研一 (HOJYO, Kenichi) [JP/JP]; 〒250-0862 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内 Kanagawa (JP). 齊藤 瑞恵 (SAITO, Mizue) [JP/JP]; 〒250-0862 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品開発研究所内 Kanagawa (JP). 竹友 直生 (TAKETOMO, Naoki) [JP/JP]; 〒189-0013 東京都東村山市栄町 1 丁目 2 1-3 明治乳業株式会社食品機能研究所内 Tokyo (JP). 古市 圭介 (FURUICHI, Keisuke) [JP/JP]; 〒189-0013 東京都東村山市栄町 1 丁目 2 1-3 明治乳業株式会社食品開発研究所内 Tokyo (JP). 池上 秀二 (IKEGAMI, Shuji) [JP/JP]; 〒250-0862 神奈川県小田原市成田 5 4 0 明治乳業株式会社食品機能研究所内 Kanagawa (JP).

- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町 1 丁目 3 番 6 号共同ビル Tokyo (JP).

[続葉有]

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING 1,4-DIHYDROXY-2-NAPHTHOIC ACID

(54) 発明の名称: 1,4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法

(57) Abstract: A composition containing 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid at a high concentration is obtained by intracellularly and extracellularly producing 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid using a bacterium belonging to the genus *Propionibacterium* and collecting it. This composition is efficacious in improving enteric flora, relieving abdominal unpleasantness in association with the intake of milk and preventing metabolic bone diseases.

(57) 要約:

プロピオニバクテリウム (*Propionibacterium*) 属菌により、菌体内外に 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸を産生させ、これを採取することで、1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸を高濃度に含有する組成物を得る。この組成物は、腸内フローラの改善、牛乳の摂取時にみられる腹部不快症状の改善及び代謝性骨疾患の予防に有効である。

BEST AVAILABLE COPY



(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR,

GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

— 明細書とは別に規則 13 の 2 に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示。

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

## 明 細 書

## 1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸の製造法

## 技術分野

本発明は、1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸 (1,4-Dihydroxy-2-naphthoic acid 或いは 1,4-Dihydroxy-2-naphthalene carboxylic acid 或いは略して DHNA と呼ぶこともある) の工業的製法、及びこの化合物を含有する腸内フローラの改善、乳糖不耐症の腹部不快症状の改善、代謝性骨疾患予防治療に有用な医薬及び飲食品に関する。

## 背景技術

これまでの母乳栄養児と人工栄養児の腸内フローラの比較研究から、ビフィズス菌が人の健康に有用であることが示唆されてきた。現在では、各種消化管疾病等や老化に伴いビフィズス菌が有意に低下することと、腸内ビフィズス菌の増殖を促進することが発癌抑制、腸内腐敗の抑制、感染症の防止等に有効であることが確認されてきている。したがって、腸内のビフィズス菌を選択的に増殖させることは、健康維持や各種成人病等の予防・治療の観点から極めて重要であるといえる。

有用なビフィズス菌を増殖促進せしめる物質、いわゆるビフィズス因子については、従来よりいくつかの物質が研究され、報告されている。例えば、母乳中に含まれる N-アセチルグルコサミン (Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 90, 219 (1955))、ペプチド関連物質 (Am. J. Clin. Nutr., 32, 1428 (1974)、Agric. Biol. Chem., 48, 2159 (1984))、人参抽出物 (日農化誌, 55, 499 (1981)、Chem. Pharm. Bull., (Tokyo) 14, 1191 (1966))、糖関連物質 (東北福祉大紀要, 10, 313 (1986)) 等がある。

しかしながら、これらビフィズス菌の増殖促進物質の調製は、いずれも煩雑で

あり、ビフィズス菌のみを選択的に増殖させるという作用においても十分とは言えない点があった。

そこで、本発明者等はビフィズス菌の増殖を選択的に促進する化合物について研究を重ねた結果、ある種のナフトキノン誘導体及びナフタレン誘導体が各種ビフィズス菌(*Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. pseudolongum*等)に対して強い増殖促進活性を有することを見出した。また、これら既知の化合物のほかに新たなビフィズス菌増殖促進物質についても明らかにしており、その物質は、プロピオニバクテリウム(*Propionibacterium*)属菌により菌体内外に産生する高活性のビフィズス菌増殖促進物質で、従来未知の新規物質である2-アミノ-3-カルボキシ-1, 4-ナフトキノンであることを確認した(特開平8-98677号公報)。さらに、2-アミノ-3-カルボキシ-1, 4-ナフトキノン等が骨粗鬆症等の代謝性骨疾患の予防治療薬として有用であることも見出した(W001/28547)。

一方、DHNAは、染料、顔料及び感光材料として工業材料として有用であることが知られており、これまでも有機化学合成法により種々の合成法が開発されてきた(特開昭57-128655, 特開昭59-186942, 特開昭60-104037公報等)。しかし、これまでの合成法は、有機溶媒中高温高圧下での反応あるいは、触媒などとして飲食用には適さない試薬等を用いる必要があった。これらの方法で製造されたDHNAから製造に用いた溶媒や試薬を完全に除去することは困難であり、従来の製造方法で得られたDHNAを飲食品や医薬に用いることは考えられていなかった。

## 発明の開示

本発明者は、ビフィズス菌に特異的な増殖促進作用を示す各種化合物についてさらに検討した結果、1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸(DHNA)がプロピオニバクテリウム(*Propionibacterium*)属菌により菌体内外に大量に産生されるこ

とを見出すと共に、この培養物から採取した1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物、又は1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩が、牛乳不耐症の牛乳の摂取時にみられる腹部不快症状を低減する作用を有すること、さらには骨芽細胞の分化と機能発現を促進し、破骨細胞の形成を抑制することから代謝性骨疾患の予防治療に有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の塩としては、薬学的又は食品学的に許容できる塩が挙げられ、代表的な塩には、酢酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、乳酸塩、クエン酸塩などが含まれるが、これらは例示であって、本発明はこれらの塩に限定されない。

すなわち、本発明は、1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸を産生する微生物を培養し、培養物中に1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸を産生させ、これを採取することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法を提供するものである。

また、本発明は、上記の製造法により得られた1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物を提供するものである。

また、本発明は、上記の製造法により得られた1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物、又は1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩を有効成分として含有する腹部不快症状改善用飲食品、腹部不快症状改善剤、整腸剤、代謝性骨疾患予防治療用飲食品又は代謝性骨疾患予防治療剤を提供するものである。

また、本発明は、上記の製造法により得られた1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物、又は1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩の、腹部不快症状改善用飲食品、腹部不快症状改善剤、整腸剤、代謝性骨疾患予防治療用飲食品又は代謝性骨疾患予防治療剤の製造のための使用を提供するものである。

さらに本発明は、上記の製造法により得られた1, 4-ジヒドロキシ-2-エ

ナフトエ酸含有組成物、又は1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩の有効量を投与することを特徴とする腹部不快症状の処置方法、整腸方法又は代謝性骨疾患の処置方法を提供するものである。

#### 図面の簡単な説明

図1は、DHNAを高濃度に含有する本発明組成物を配合した乳飲料摂取から6時間後までに感じた腹部の膨満感の強さを示すグラフである。

図2は、DHNAを高濃度に含有する本発明組成物を配合した乳飲料摂取から6時間後までに腹部の膨満感を訴えた回数を示すグラフである。

図3は、DHNAを高濃度に含有する本発明組成物を配合した乳飲料摂取から6時間後までに感じた鼓腸（ゴロゴロ感）を訴えた回数を示すグラフである。

図4は、DHNAの骨芽細胞石灰化能促進効果を示すグラフである。

図5は、DHNAの骨密度低下抑制効果を示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明における、1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (DHNA) を産生する菌の属の例としては、プロピオニバクテリウム (*Propionibacterium*)、エンテロバクター (*Enterobacter*)、スポロラクトバチルス (*Sporolactobacillus*)、バチルス (*Bacillus*) 等があげられる。これらの微生物の多くは、従来より飲食品及び医薬品の製造に用いられてきたものであり、DHNAを含有する飲食品及び医薬品を製造する上でこれらの菌を用いることは好ましい。プロピオン酸菌としては、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ (*Propionibacterium freudenreichii*)、プロピオニバクテリウム・トエニー (*P. thoenii*)、プロピオニバクテリウム・アシディプロピオニシ (*P. acidipropionici*)、プロピオニバクテリウム・ジェンセニー (*P. jensenii*) などのチーズ用の菌、プロピオニバクテリウム・アビダム (*P. avidum*)、プロピオニバクテリウム・ア

クネス (*P. acnes*)、プロピオニバクテリウム・リンホフィラム (*P. lymphophilum*)、プロピオニバクテリウム・グラニューロサム (*P. granulosum*)などが挙げられる。また、バチルス属の菌としてはバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・コアギュランズ (*Bacillus coagulans*)などが挙げられる。本発明に使用する微生物としては、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒが好適であり、例えば *P. freudenreichii* IFO 12424、あるいは *P. freudenreichii* ATCC 6207が挙げられる。

本発明により、DHNAを製造するには、まずDHNAを産生する能力を有する菌株を、通常の微生物が増殖し得る栄養源を含む培地で好氣的又は嫌氣的に培養する。栄養源としては従来から微生物の培養に用いられている公知のものが使用できる。特に、脱脂粉乳培地、トリブチケース、フィトン、酵母エキス及びグルコースからなる培地の他、ホエイ粉、或いはそのプロテアーゼ処理物、或いはホエイ蛋白質濃縮物、その処理物及び乳清ミネラルのラクターゼ処理物を主成分とする培地が好適に用いられるが、本発明においては、培地の蛋白源として脱脂粉乳のプロテアーゼ処理物を用いることが最も望ましく、その際、培養時の添加物として、酵母エキス、乳糖の少なくともひとつを使用することで、培養液のDHNA産生量を増大させることができる。また、培養時の添加物として、乳糖の他、グルコース又は乳糖のラクターゼ処理物も使用できるが、脱脂粉乳のプロテアーゼ処理物を培地の主原料に使用した場合には、糖質として乳糖が最も好ましい。以下に、培地原料に脱脂粉乳のプロテアーゼ処理物を用いた場合の培地調製法の一例を示す。

脱脂粉乳を10% (w/v)の濃度になるように水で溶解し、プロテアーゼでタンパク質を分解する。使用量は、脱脂粉乳量に対し、0.25% (w/w)とする。分解は、47℃、pH 6.8で6時間行い、分解中のpH調整には炭酸カリウム水溶液を用いる。最終的な培地濃度として脱脂粉乳濃度を10% (w/v)に調整し、最後に、酵母エキスを脱脂粉乳量に対し、1～10% (w/w)、好適には3～7%

(w/w)添加する。

培養方法としては、公知の各種好氣的、嫌氣的培養方法を用いることができるが、液体培地による好気又は嫌気培養法が大量生産の上から最も好ましい。培養温度は約20～40℃、培地のpHは中性～微酸性（好ましくはpH5.5-7.5）の条件下で培養する。液体培養では、培養開始後約1～5日経過すると培地及び菌体中にDHNAが蓄積される。培養中に乳糖を添加することによりDHNAの産生量は増加する。培養を停止し、直ちにその培養物よりDHNAの採取に供することも可能であるが、好ましくは、培養液を冷却（3～20℃、より好ましくは約10℃）し、保存（好ましくは2～4週間程度）することによりDHNAをさらに蓄積させることができる。

次に、DHNAの採取方法について説明する。得られた培養物を吸着クロマトグラフィーに付すのが好ましい。吸着剤としては、活性炭や合成吸着剤（例えばダイアイオンHP-20、三菱化学（株）製）などの逆相系の吸着剤を広く使用することができる。まず、吸着剤をカラムに充填し、0.5% (w/v) アスコルビン酸ナトリウム水溶液で洗浄する。次いで、得られた培養物をカラムに添加し（通過液をpassとした）、さらに0.5% (w/v) アスコルビン酸ナトリウム水溶液で水溶性画分を除去する。その後、0.5% (w/v) 量アスコルビン酸ナトリウムを添加したエタノールで溶出し、このエタノール溶出画分を濃縮することで、DHNAを高濃度に含む組成物を得ることができる。さらに、精製を行い、純粋なDHAN又はその塩を得ることができる。尚、カラムからのDHNAの溶出液としてエタノールの代わりにメタノールを用いてもよい。

DHNAの塩としては、薬学的又は食品学的に許容できる塩が挙げられ、代表的な塩には、酢酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、安息香酸塩、重炭酸塩、乳酸塩、クエン酸塩などが含まれるが、これらは例示であって、本発明はこれらの塩に限定されない。

DHNAは、DHNA産生菌の培養物中（菌体内及び／又は外）に含有されて



いるので、吸着クロマトグラフィーを適用せずに培養物それ自体をロータリーエバポレーター等を使用し、濃縮することによってDHNAを高濃度に含有する組成物を得ることができる。また、通常の遠心分離法によって培養物から菌体を分離し得られた上清を濃縮することも好ましい。こうして得られた組成物は、利用する形態にあわせ、液状のまま用いてもよいし、粉末状に加工することもできる。

牛乳を飲んだ後に腹痛や腹鳴、下痢などの腹部不快症状をおこすものを牛乳不耐症と呼ぶが、この中の大部分は牛乳中等の乳糖を摂取したことによって起こる乳糖不耐症に相当する。そして、その原因の多くの場合、小腸ラクターゼ活性の欠乏又は減少によっている。本発明に係る組成物又はDHNAもしくはその塩は、牛乳の摂取時にみられる腹部不快症状を低減する作用を有し、さらには骨芽細胞の分化と機能発現を促進する作用、破骨細胞の形成抑制作用を有し、骨粗鬆症等の代謝性骨疾患の予防治療に有用である。飲食品又は医薬品いずれの形態でも利用することができ、例えば、医薬として直接投与することにより、或いは特定保健用食品等の特別用途食品、栄養機能食品として直接摂取することにより、あるいはまた、各種食品（牛乳、発酵乳、ヨーグルトその他）に添加しておきこれを摂取することによって、腸内フローラの改善や牛乳の摂取時等にみられる腹部不快症状を低減し、また代謝性骨疾患を予防治療することができる。

本発明に係る組成物、又はDHNAもしくはその塩を医薬品として使用する場合には、種々の形態で投与することができる。その形態として、例えば、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与をあげることができる。これらの各種製剤は、常法に従って主剤に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、矯味、矯臭剤、溶解補助剤、懸濁剤、コーティング剤などの医薬の製剤技術分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。

この製剤をヒトに適用する場合、経口投与するのが好ましい。有効成分であるDHNAの治療有効量は治療される各患者の年齢及び条件によって変動するが、

一般にDHNAとして、ヒト体重1kgあたり1日量0.03~3 $\mu$ g、より好ましくは0.1~1 $\mu$ g経口投与する。

本発明に係る組成物、又はDHNAもしくはその塩は、経口投与によって腸内フローラの改善や牛乳の摂取時にみられる腹部不快症状を低減する、代謝性骨疾患を予防又は治療するという所期の目的を達成しうるので、飲食品として使用することができる。そのためには、DHNAを高濃度に含む本発明組成物又はDHNAもしくはその塩を各種補助剤や他の飲食品を用いて、ドリンク、錠剤、その他各種の飲食品にしたり、飲食品に直接添加する等、各種の方法を利用することができる。このように飲食品にすることで、長期間に亘って摂取することが可能であるため、通常の飲食品の他、特定保健用食品等の特別用途食品、栄養機能食品として市販に供することができる。

#### 実施例

以下、試験例、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、これらは本発明を限定するものではない。

#### 試験例1 DHNA産生菌のスクリーニング

##### 培養条件

脱脂粉乳培地（後記する実施例1に記載）にそれぞれ下記供試菌を摂取し、37℃で18~72時間、ガスパック法にて嫌気培養した。

- (A) *Propionibacterium freudenreichii* IF0 12424 （培養時間：72時間）
- (B) *Propionibacterium acidipropionicii* IF0 12425 （72時間）
- (C) *Propionibacterium jensenii* IF0 12427 （72時間）
- (D) *Lactococcus lactis* ATCC 10697 （24時間）
- (E) *Leuconostoc mesenteroides* JCM 9700 （24時間）
- (F) *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4357 （18時間）
- (G) *Lactobacillus plantarum* IF0 12006 （18時間）

- (H) *Lactobacillus rhamnosus* JCM 1136 (18時間)  
(I) *Lactobacillus casei* ATCC 7469 (18時間)  
(J) *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 (18時間)  
(K) *Bifidobacterium bifidum* ATCC 11146 (18時間)  
(L) *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703 (18時間)  
(M) *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 (18時間)

#### DHNA分析条件 (HPLC分析)

カラム: C18、充填剤粒径  $3\mu\text{m}$ 、内径  $4.6\text{mm}$ 、長さ  $150\text{mm}$

(C18: インタクト (株) の *Cadenza* CD-C18)

溶離液: アセトニトリル: メタノール: 水: 酢酸 = 10:20:200:0.1

(5%アンモニア水でpH 7.0に調整)

流速:  $1.5\text{mL}/\text{min}$

注入量:  $20\mu\text{l}$

検出器: UV254nm

#### HPLCサンプル調製法

各培養液  $10\text{ml}$  に  $0.1\%$  (w/v) のアスコルビン酸ナトリウムを添加後、pH 7.0に調整し、水で全量を  $20\text{ml}$  にした後、そのうち  $3\text{ml}$  を等量のメタノールと混合して、 $3000\text{rpm}$  で10分間遠心分離し、その上清液を  $0.45\mu\text{m}$  のフィルターでろ過した。

#### DHNAの定量

HPLCサンプル中のDHNA量は、予め求めた市販のDHNA (和光純薬 (株) 製) 標品の保持時間 (13分付近)、及びHPLCのピーク面積とDHNA濃度との関係 (検量線) をもとに算出した。

その結果、DHNAはプロピオニバクテリウム (A) ~ (C) から  $3.0\mu\text{g}/\text{ml}$  以上検出された。ラクトコッカス (D)、ロイコノストック (E) からは微量に検出されたものの、ラクトバチルス (F) ~ (I)、ビフィドバクテリウ

ム (J) ~ (M) からは検出することができなかった。すなわち、プロピオニバクテリウムは、本発明に使用しうるDHNA産生菌として望ましいことが確認された (表1)。Bacillus subtilisについても同培地を用い、好氣的に培養したところ、培養物にはDHNAが含有されていることが確かめられた。

表1

供試菌	培養時間 (hr)	DHNA ( $\mu$ g/ml)
(A)	72	3.0
(B)		3.2
(C)		3.6
(D)	24	0.1
(E)	24	0.2
(F)	18	N. D.
(G)		N. D.
(H)		N. D.
(I)		N. D.
(J)	18	N. D.
(K)		N. D.
(L)		N. D.
(M)		N. D.

N. D. : 検出されず。

#### 実施例1 DHNA含有組成物の製造法

脱脂粉乳を10% (w/v) の濃度になるように水で溶解した脱脂粉乳培地 (脱脂粉乳の10重量%還元液) にビール酵母エキス (アサヒビール (株) 製) を0.1% (w/v) 添加した液50Lを容量5Lの三角フラスコ20本に分注し、121℃、7分間オートクレーブで滅菌した。これらの培地にプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ (*Propionibacterium freudenreichii*) IFO 12424株の賦活培養液60mlをそれぞれ接種し、37℃で72時間、窒素雰囲気下、嫌気培養したところ、1, 4-ジヒドロキシー-2-ナフトエ酸を3

$\mu\text{g}/\text{ml}$  含有する組成物 (50L) が得られた。なお、前記賦活培養液は、TPYG培地 (トリプチケース (BBL) 8g、フィトンペプトン (BBL) 3g、ビール酵母エキス 5g、L-システイン塩酸塩 0.5g、グルコース 20g、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  10mg、 $\text{H}_2\text{O}$  1000ml、pH6.5) に2% (w/v) のプロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ (*Propionibacterium freudenreichii*) を接種し、37℃で72時間ガスパック法にて嫌気培養することを得る。

#### 実施例2 DHNA高濃度含有組成物の製造法

脱脂粉乳を10～20% (w/w) の濃度になるように水で溶解し、プロテアーゼ [アマノA] (アマノ製薬(社)製) を脱脂粉乳量の0.25% (w/w) 添加し、47℃で6時間酵素分解した。この間、炭酸カリウム水溶液でpH6.8に保持した。85℃、5分間加熱して酵素を失活させた後、脱脂粉乳量が10% (w/w) となるよう水でメスアップした。ビール酵母エキス (アサヒビール(社)製) を脱脂粉乳の5% (w/w) 量添加した後、2L容量のファーマンターに1.5Kg分注し、121℃、7分間オートクレーブで滅菌した。ファーマンター中に窒素ガスを上面通気で流し、撹拌は150rpmで行い、培地温度を33℃に調整した。培地温度が33℃に安定したら、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ (*Propionibacterium freudenreichii*) ET-3株 (平成13年8月9日付で、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566)) にFERMBP-8115として寄託されている) の凍結濃縮スターターを培地に対し0.05% (w/w) 接種し、培養を開始した。途中、培養開始72時間後と96時間後に、培養液に対し、2% (w/w) 量の乳糖と、1.3% (w/w) 量の乳糖を添加した。33℃で120時間、40% (w/w) 炭酸カリウム水溶液でpH6.45に保ちながら窒素雰囲気下で嫌気培養したところ、この時点で、培養液中に30 $\mu\text{g}/\text{ml}$  の

DHNAが産生された。なお、培養開始120時間後のアルカリ消費量は培養液1.5kgに対し、131gであった。さらに、この培養液にアスコルビン酸ナトリウムを培養液の0.5%(w/w)量添加し、炭酸カリウム水溶液でpHを8.0に調整後、10℃まで冷却した。これを10℃で2週間保存した結果、培養液中のDHNAの含量は、40 $\mu$ g/mlまで増加した。凍結濃縮スターターは、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ(*Propionibacterium freudenreichii*)ET-3株の賦活培養液(上記脱脂粉乳のプロテアーゼ処理物を主成分とする培養液で33℃で48時間窒素雰囲気下で嫌気培養する)を、培地(脱脂粉乳のプロテアーゼ処理物を主成分とする培養液)に対して2%(w/w)量接種し、33℃で72時間培養し、培養終了後、培地を回収して遠心分離し、菌体を20倍程度に濃縮した。その後、適量を滅菌した容器に分注し、-80℃以下で凍結し、-80℃で保存したものを使用した。

実施例3 実施例1で得られた組成物のカラムクロマトグラフィーによる濃縮  
ダイアイオンHP-20(4L)をカラムに充填し、0.5%(w/v)アスコルビン酸ナトリウム水溶液で洗浄後、実施例1で得られた組成物40Kgをカラムに添加した。次に0.5%(w/v)アスコルビン酸ナトリウム水溶液8Lで水溶性画分を除去後、エタノール12Lを流してDHNAを溶出させた。溶出液にはさらに0.5%(w/v)量アスコルビン酸ナトリウムを添加した。本エタノール画分をエバポレーターで濃縮し、DHNAを115mgを含む10gの本発明組成物を得た。

実施例4 実施例1で得られた組成物のロータリーエバポレーターによる濃縮  
実施例1で得られた組成物5Kgに0.5%(w/w)量アスコルビン酸ナトリウムを添加し、ロータリーエバポレーターにて5倍に濃縮したところ、1Kg中にDHNAを15mg含む本発明組成物が得られた。

実施例1～3の組成物の製造には、チーズの製造に用いられているプロピオン酸菌を用いているため、実施例1～3で得られた本発明品をそのまま飲食品とし

て用いることができる。

#### 実施例 5 DHNAの精製

実施例 2 で得られた濃縮物を pH 4.5 に調整した 0.5 % (w/v) アスコルビン酸ナトリウム水溶液 1 L に溶解し、酢酸エチル 1 L で 3 回抽出した。酢酸エチル層をあわせて、無水硫酸ナトリウム 200 g で脱水後減圧下濃縮した。濃縮物をメタノール 80 mL に溶解後、その 4 mL を C18 カラムで精製した。保持時間 21 分から 31 分の DHNA 溶出画分に 25 % (w/v) となるようにアスコルビン酸ナトリウムを加えた後、減圧下濃縮した。この濃縮物 800 mL を酢酸エチル 300 mL で 2 回抽出し、無水硫酸ナトリウム 50 g で脱水後減圧下濃縮した。得られた最終精製物を 500MHz <sup>1</sup>H-NMR にて構造を解析したところ DHNA であると同定した。最終的に培養液 40 L から DHNA 115 mg が得られた。カラム：Capcell Pak C18 SG120, φ50×500mm, Lot.930210 (資生堂 (株) 製) 移動層：アセトニトリル：メタノール：水：酢酸=20:40:200:0.1 (5%アンモニア水で pH 7.0 に調整)

温度：室温

流速：100mL/min

注入量：4mL

検出器：UV254nm

#### <最終精製物のNMRデータ>

<sup>1</sup>H-NMR (500MHz, MeOH-d<sub>4</sub>): δ 8.39 (1H, d, J=8.3Hz), 8.23 (1H, d, J=8.3Hz), 7.69 (1H, dd, J=8.3, 6.9Hz), 7.60 (1H, dd, J=8.3, 6.9Hz), 7.23 (1H, s)

#### 実施例 6 急性毒性試験

マウス 5 匹 (5 週齢：ICR を購入後、7 日間馴化) を用いて実施例 2 記載の DHNA 含有組成物の急性毒性試験を実施した。1 日当たり 78.3 mg/kg (DHNA は、0.9 (≒ 115 × (78.3 / (10 × 1000))) mg/kg) を最高投与量として 5 日間連続投与し、14 日間観察したが、死亡は認

められず、体重、行動、臓器の解剖所見を調べたが何れも異常がないことを確認した。

実施例7 DHNAを含有する本発明組成物を配合した食品の調製法（タブレットの調製）

実施例1で得られた組成物10Kgを品温50℃で24時間凍結乾燥し、凍結乾燥粉1Kgを得た。次に同粉末をブドウ糖80%（w/w）と乾燥コーンスターチ10%（w/w）、粉末パラチニット7%（w/w）、クエン酸3%（w/w）から成るタブレット基剤に40%（w/w）配合し、0.5g毎に打錠した。

実施例8 DHNAを含有する本発明組成物を配合した食品の調製法（乳飲料の調製1）

生乳10Kgにアスコルビン酸ナトリウム15g及びDHNAを含有する実施例2より得られた組成物125mgを添加し、これを均質化した後に130℃で2秒間殺菌し、100ml毎に容器に充填した。

実施例9 DHNAを含有する本発明組成物を配合した食品の調製法（乳飲料の調製2）

プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ（*Propionibacterium freudenreichii*）ET-3株（FERM P-18454）をホエイ粉のプロテアーゼ処理物を主原料とする培地（10重量%ホエイ粉還元液をプロテアーゼ（天野製薬（株）製：アマノA）で2時間タンパク分解（50℃、pH7.0）した溶液にビール酵母エキス（アサヒビール製）を0.1%（w/v）添加した液50Lをジャーファーマンターに供し、121℃、7分間滅菌した）に、賦活培養液60mlを接種し、35℃、pH6.0で90時間、嫌気培養後、0.5%（w/v）のアスコルビン酸ナトリウムを添加することで得られた本発明組成物177.5mlを、生乳9822.5mlに添加し、これを均質化した後に130℃で2秒間殺菌し、100ml毎に容器に充填した（DHNA含量11μg/100ml）。

前記賦活培養液は、培養温度35℃以外は、実施例1と同様の方法で得る。



## 実施例 10 乳飲料摂取時にみられる腹部不快症状の本発明品による影響 1

試験飲料として実施例 8 で調製した乳飲料を用い、対照飲料として発酵前の培地を用いて同様に調製した乳飲料を用いた。被験者は、牛乳摂取による呼気中水素ガス濃度の測定を行い、小腸の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が低く乳糖不耐症と考えられるヒトを選定した。具体的には、対照飲料 400 ml によるラクトース負荷試験を行い、呼気中の水素濃度が飲料摂取から 6 時間までに約 20 ppm 以上増加した 15 名（男性 7 名、女性 8 名、平均年齢  $28.07 \pm 3.41$  才）を被験者とした。

被験者は、試験前日 22 時から試験当日 17 時まで水以外の飲食をしないように制限した。試験当日 10 時に対照飲料 400 ml を経口摂取し、経時的に 17 時までアンケートによる腹部症状の記入（30 分毎）と呼気の採取（1 時間毎）を行った。試験飲料の投与は、1 週間後に対照飲料の投与と同じ要領にて実施した。なお、被験者には飲料の種類についての事前の告知は一切行わなかった。

呼気は 1 L 容のコック付テドラーバッグ（ジーエルサイエンス（株））にて採取し、水素ガスの分析はガスクロマトグラフィー（GC-8A、島津製作所（株））にて行った。分析条件は、カラム：モレキュラーシーブ 5A（3 mm  $\times$  2 m）、オープン温度：40℃、キャリアガス：アルゴン、検出器：熱伝導度型検出器（TCD: Thermal Conductivity Detector）とした。

アンケート用紙を各被験者に配布し、30 分毎に腹部症状について自己記入方式で調査した。腹部膨満感は、「摂取直後に比較して非常におなかが張る」を 4、「摂取直後に比較しておなかが張る」を 3、「摂取直後に比較して少しおなかが張る」を 2、「摂取直後に比較して変わらない」を 1 として数値化し、摂取 30 分後から 6 時間までの値を累積した。また、その他の腹部症状として下痢、腹痛、鼓腸（ゴロゴロなる）があった際にはアンケート用紙に併記させた。

乳飲料摂取から 6 時間後までの腹部症状を調べたところ、対照飲料摂取において腹部膨満感の累積値が  $17.93 \pm 4.83$  であったのが、試験飲料では

15.93 ± 3.65 と有意 (wilcoxon検定、 $p < 0.05$ ) に減少した (図1)。また、摂取6時間後までに被験者が膨満感を訴えた回数を観察したところ、対照飲料摂取において3.47 ± 3.11であったものが、試験飲料において2.47 ± 2.90と減少傾向 ( $p = 0.108$ ) であった (図2)。同様に、鼓腸 (ゴロゴロ感) を訴えた回数も対照飲料摂取において2.87 ± 2.75であったものが、試験飲料において1.47 ± 2.10と有意 ( $p < 0.05$ ) に減少した (図3)。その他の腹部症状では、対照飲料摂取では下痢を呈する被験者が2名いたが、試験飲料摂取では下痢を訴える被験者がいなかったほか、対照飲料摂取で腹部不快症状がなかった被験者が2名であったのに対し、試験飲料摂取では6名に増加した (表2)。

また、呼気水素濃度の最大上昇量を求めたところ、対照飲料摂取での最大呼気水素濃度上昇量の平均値は42.9 ± 13.7 ppmであった。一方、試験飲料摂取後の最大呼気水素濃度上昇量の平均値は34.7 ± 17.6 ppmとなり、対照飲料摂取に比較して減少傾向 (wilcoxon検定、 $p = 0.051$ ) であった (表2)。

表 2

DHNA含有組成物を含有する乳飲料の摂取が腹部不快症状及び呼吸気水素濃度に及ぼす影響

被験者		対照飲料摂取		試験飲料摂取	
No.	年齢 性別	呼吸気水素濃度*	腹部症状 <sup>§</sup>	呼吸気水素濃度*	腹部症状 <sup>§</sup>
1	27 女性	30.2	B, C	21.8	B
2	25 女性	50.0	N	33.9	N
3	28 女性	19.2	B, C	6.7	C
4	24 女性	32.1	B, C	13.6	B
5	26 男性	N.T.	C	N.T.	C
6	32 男性	N.T.	C	N.T.	N
7	28 男性	N.T.	C	N.T.	C
8	27 女性	54.8	A, B, C	46.6	B, C
9	27 男性	51.0	C	44.2	N
10	32 男性	41.2	N	21.5	N
11	25 女性	42.2	B	38.1	B, C
12	23 女性	30.8	B	59.1	N
13	34 女性	N.T.	A, C	N.T.	N
14	33 男性	63.2	C	60.0	C
15	30 男性	57.7	C	35.7	C
Mean ± S.D.		42.9 ± 13.7		34.7 ± 17.6	

\* : 最大呼吸気水素増大量 (ppm)

§ : A: 下痢、B: 腹痛、C: 鼓腸、N: 自覚症状なし

N.T.: Not tested.

## 実施例 1 1 乳飲料摂取時にみられる腹部不快症状の本発明による影響 2

プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ (*Propionibacterium freudenreichii*) I F O 1 2 4 2 4 株を実施例 9 と同様の方法で培養し得られた培養物 5 K g をさらにエバポレーターで 5 倍濃縮したところ、1 K g 中 DHNA を 4 5 m g 含む組成物が得られた。得られた組成物 3 5 . 5 g に生乳 1 0 k g 、アスコルビン酸ナトリウム 1 5 g を用いて調製した乳飲料で実施例 1 0 と同様の実験を行ったところ、本発明組成物を含有する乳飲料の摂取により、実施例 1 0 とほぼ同様の結果が得られ、乳飲料摂取時にみられる腹部不快症状が改善されることが確認された。

## 実施例 1 2 DHNA の骨芽細胞石灰化能促進効果

骨折手術時に得られた 2 0 歳男性の長管骨骨膜より樹立した培養ヒト骨芽細胞 (S a M-1) を使用した。この S a M-1 細胞は骨芽細胞の特徴をすべて保持していた (Koshihara, Y. et al.: *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 25: 37-43, 1989)。S a M-1 は、2 m M の  $\alpha$ -グリセロリン酸存在下で、 $1 \alpha, 2 5 (\text{OH})_2 \text{D}_3$  の濃度に依存して石灰化を促進することが知られている (Koshihara, Y. et al.: *Biochem. Biophys. Res. commun.*, 145: 651-657, 1987)。

1 8 P D L (population doubling level) の S a M-1 を 1 2 穴プレートに播き、コンフルエントになるまで培養した。つぎに石灰化促進剤である、 $\alpha$ -グリセロリン酸を 2 m M になるように添加した。この培養系に、 $1 0^{-7} \text{M} \sim 1 0^{-5} \text{M}$  の DHNA を添加し 3 2 日間培養した。対照には溶媒の D M S O を培養液の 0 . 1 % になるように加えた。培地はそれぞれの試験物質を含む培地で 1 日おきに交換した。石灰化度はヒドロキシアパタイトの構成成分である C a 量で表した。

細胞外マトリックス中の C a は、o-cresolphthalein complexone 法 (OCPC 法) (Gitleman, H. J.: *Anal. Biochem.*, 18: 520-531, 1967) に基づいたキット (カルシウム C テストワコー) により定量した。

培養終了後Hank's液にて細胞を洗浄した。冷5%過塩素酸 0.5 mL/ウェルを加えて、4℃で15分間振盪抽出した。抽出液25  $\mu$ Lと緩衝液2.5 mLを混合後、発色液(OCPC 0.4 mg/mL、8-キノリノール含有) 250  $\mu$ Lを加えて攪拌し、5分後にその反応液を吸光度計(570 nm)にて測定した(図4)。図4から、DHNAは、濃度に依存して石灰化を促進することが確認された。

#### 実施例13 FK-506誘発骨粗鬆症モデル動物に対するDHNAの効果

免疫抑制剤として知られるFK-506を動物に投与する事により骨粗鬆症様の病態を引き起こすことが知られている(J. Hard Tissue Biology, 103-107, 10(2), 2001)が、これは、骨芽細胞上に発現されるRANKL(破骨細胞分化因子)の発現亢進により破骨細胞形成が進み、骨吸収優位となって骨粗鬆症病態を呈することが示唆されている。8週齢のICR雄性マウスにFK-506を1 mg/kgで10週間連続腹腔内投与した。この間、餌(CRF-1、オリエンタル酵母社製)は自由摂取とし、DHNAを毎日75  $\mu$ g/kgを1%DMSO(ジメチルスルホキシド)水溶液に懸濁させて経口投与した。その結果、DHNA投与群は、コントロール群(FK506(+))に比べて有意に骨密度が高く、FK506投与による骨密度の低下が抑制されていることが明らかとなった(図5)。

#### 産業上の利用可能性

本発明に係るDHNAの工業的製法は、微生物に由来することから、安全性に優れており、DHNAを高濃度に含む本組成物を経口摂取することで、腸内フローラの改善はもとより、牛乳の摂取時にみられる腹部不快症状の改善及び代謝性骨疾患の予防治療にも利用することができる。また、毒性がないことから、長期間摂取することが可能である。

## 請求の範囲

1. 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸を産生する微生物を培養し、培養物中に1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸を産生させ、これを採取することを特徴とする1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。

2. 培養が、脱脂粉乳のプロテアーゼ処理物を主成分とする培地又はホエイ粉プロテアーゼ処理物を主成分とする培地を用いるものである請求項1記載の1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。

3. 培養時の添加物として、酵母エキス、乳糖の少なくともひとつを使用するものである請求項1又は2記載の1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。

4. 培養終了後、培養液を3～20℃に冷却し保存するものである請求項1～3のいずれか1項に記載の1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。

5. 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の採取が、1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有培養物を吸着クロマトグラフィーに付して1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸を吸着させ溶出するものである請求項1記載の1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。

6. 溶出液をさらに濃縮する請求項5記載の1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸の製造法。

7. 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸産生菌として、プロピオニバクテリウム属 (Propionibacterium)、エンテロバクター属 (Enterobacter)、スポロラクトバチルス属 (Sporolactobacillus) 及びバチルス (Bacillus) 属からなる群から選ばれる微生物を使用する請求項1～6のいずれか1項に記載の製造法。

8. 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸産生菌として、プロピオニバクテリウム・フロイデンライヒ (Propionibacterium freudenreichii) を使用する請

求項 7 に記載の製造法。

9. 請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の製造法により得られた 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸含有組成物。

10. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩を有効成分として含有する腹部不快症状改善用飲食品。

11. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩を有効成分として含有する腹部不快症状改善剤。

12. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩を有効成分として含有する整腸剤。

13. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩を有効成分として含有する代謝性骨疾患予防治療用飲食品。

14. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩を有効成分として含有する代謝性骨疾患予防治療剤。

15. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩の腹部不快症状改善用飲食品製造のための使用。

16. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩の腹部不快症状改善用医薬製造のための使用。

17. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩の整腸用医薬製造のための使用。

18. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩の代謝性骨疾患予防治療用飲食品製造のための使用。

19. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩の代謝性骨疾患予防治療剤製造のための使用。

20. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸もしくはその塩の有効量を投与することを特徴とする腹部不快症状の処置方法。

21. 請求項 9 記載の組成物、又は 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸も

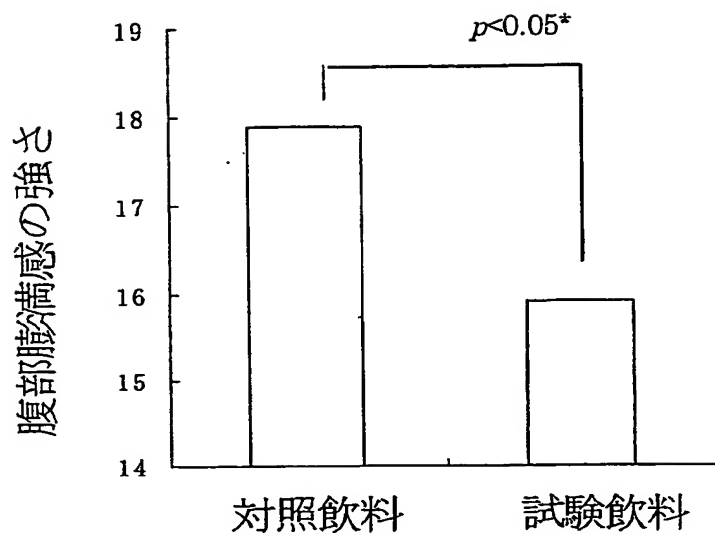
しくはその塩の有効量を投与することを特徴とする整腸方法。

22. 請求項9記載の組成物、又は1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸も

しくはその塩の有効量を投与することを特徴とする代謝性骨疾患の処置方法。

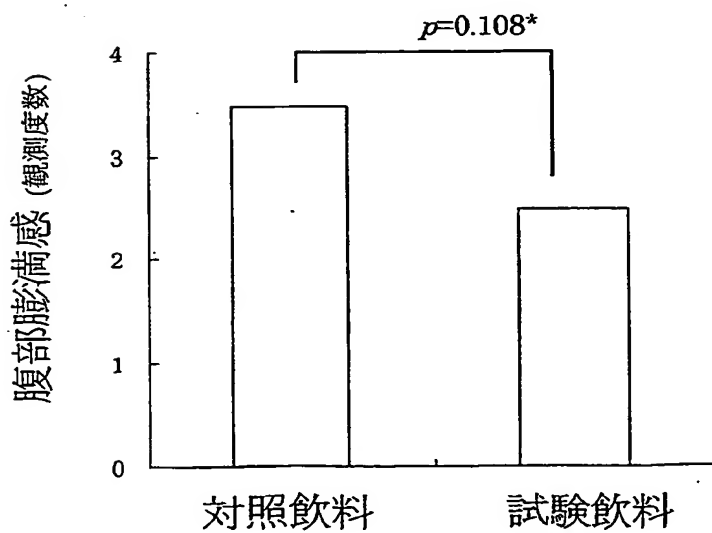


図 1



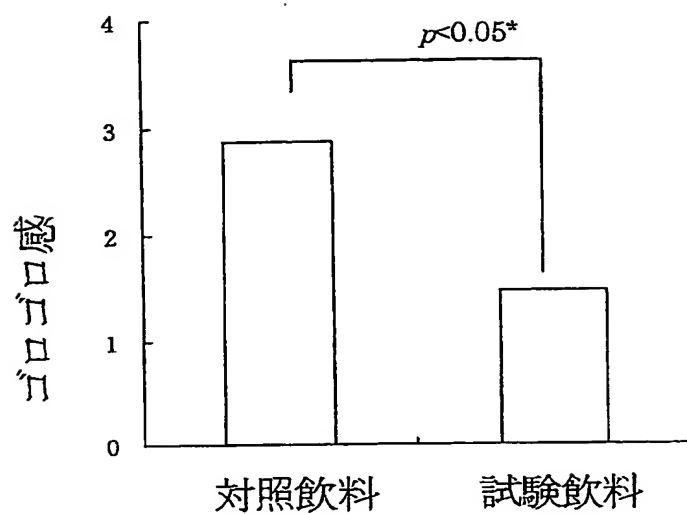
\*: Wilcoxon検定

図 2



\*: Wilcoxon検定

図 3



\*: Wilcoxon検定

図 4

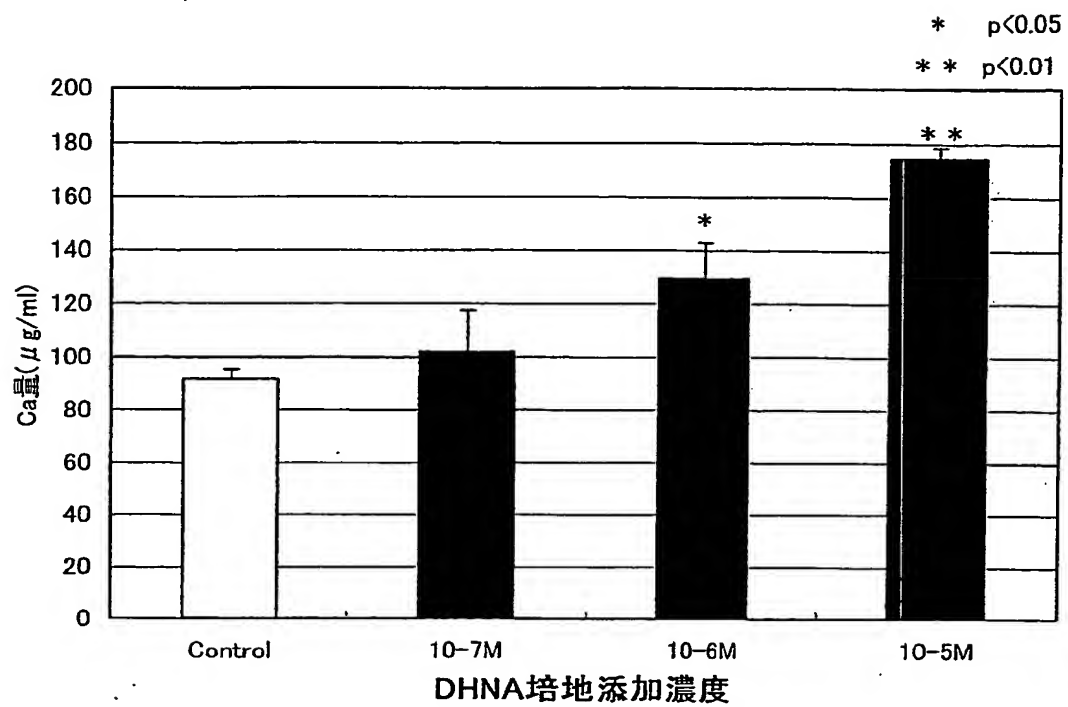
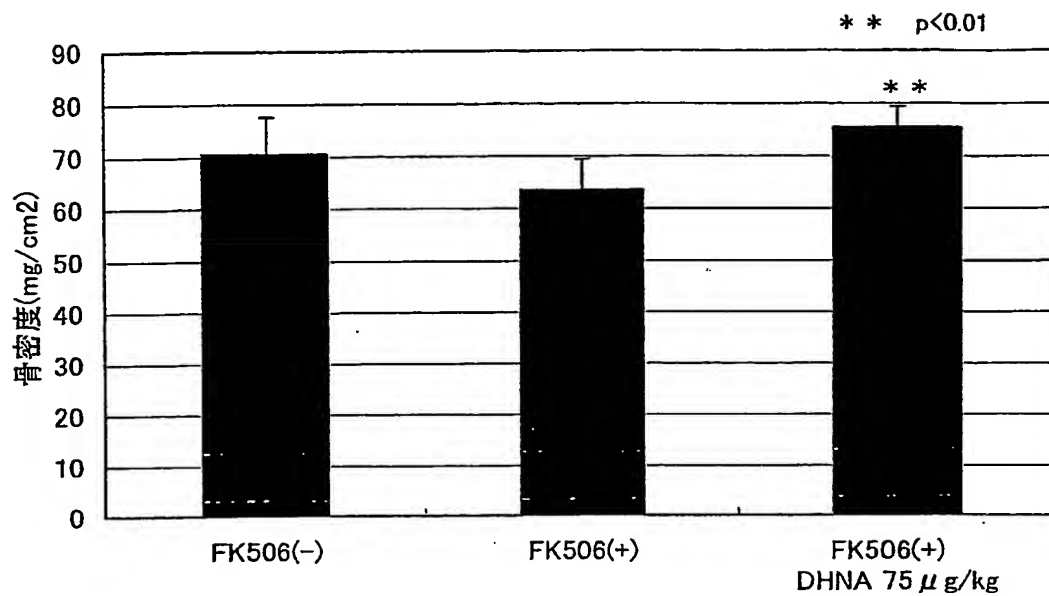


図 5



1/1

PCT

原本（出願用） - 印刷日時 2002年08月06日 (06. 08. 2002) 火曜日 13時07分31秒

0-1	様式-PCT/RO/134 (EASY) この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01. 06. 2002)
0-1-1		
0-2	国際出願番号.	PCT/JP 02/08010
0-3	出願人又は代理人の書類記号	MM0038

1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。	
1-1	記載頁	11
1-2	行	19
1-3	寄託の表示	
1-3-1	寄託機関の名称	独立行政法人 産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (IPOD)
1-3-2	寄託機関のあて名	〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 1 中央第6
1-3-3	寄託の日付	2001年08月09日 (09. 08. 2001)
1-3-4	受託番号	IPOD FERM BP-8115
1-4	追加の表示	ヨーロッパ特許庁については、寄託微生物試料はEPC規則28(4)に従って、ヨーロッパ特許が発行される迄、請求人が指定した専門家に対してのみ入手可能とされることを要請する。
1-5	この表示を行うための指定国	EP: (AT BE BG CH&LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE SK TR); AT BG CH&LI CZ DE DK EE ES FI GB LU PT SE SK TR
1-6	追加事項の表示の届け出 右記の表示は後に国際事務局に届け出る予定である。	なし (NONE)

## 受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	✓
0-4-1	権限のある職員	坂野 真

## 国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	23 AUGUST 2002
0-5-1	権限のある職員	中村 由香里

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08010

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/42, A61K31/192, A61P1/04, 1/12, 1/14, 19/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12P7/42, A61K31/192, A61P1/04, 1/12, 1/14, 19/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	MEGANATHAN, R., et al, "Menquinone (Vitamin K <sub>2</sub> ) biosynthesis: Conversion of o-succinylbenzoic acid to 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid by Mycobacterium phylei enzymes", J. Bacteriol., October 1979, Vol.140, No.1, pages 92 to 98; full text	<u>1-6, 9</u> 7, 8
X	WO 01/28547A1 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.), 26 April, 2001 (26.04.01), Claims & AU 007947300 A	7-9, 13, 14, 18, 19

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 October, 2002 (09.10.02)Date of mailing of the international search report  
29 October, 2002 (29.10.02)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08010

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 8-98677 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 16 April, 1996 (16.04.96), Claims; examples 1 to 8 (Family: none)	<u>9</u> 10-12,15-17
X Y	JP 2000-256201 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 19 September, 2000 (19.09.00), Claims; examples 1 to 4 (Family: none)	<u>9</u> 10-12,15-17
Y	KANEKO, T. and NODA, K., "Bifidogenic growth stimulator produced by propionic acid bacteria", Japanese Journal of Dairy and Food Science, 1995, Vol.45, No.4, pages 83 to 91, table 2 to 4	10-12,15-17
Y	JP 2001-169749 A (Nitto Yakuhin Kogyo Kabushiki Kaisha), 26 June, 2001 (26.06.01), Par. No. [0002] (Family: none)	10-12,15-17
Y	JP 2000-86525 A (Morishita Jintan Co., Ltd.), 28 March, 2000 (28.03.00), Par. No. [0003] (Family: none)	10-12,15-17
Y	JP 11-228424 A (Kyodo Nyugyo Kabushiki Kaisha), 24 August, 1999 (24.08.99), Par. No. [0002] (Family: none)	10-12,15-17
A	JP 10-14589 A (Unitika Ltd.), 20 January, 1998 (20.01.98), Full text (Family: none)	1-9
A	JP 9-75095 A (Unitika Ltd.), 25 March, 1997 (25.03.97), Full text (Family: none)	1-9

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1998)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/08010

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1.
- ☒
- Claims Nos.: 20-22

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The above claims pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

- 2.
- ☐
- Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3.
- ☐
- Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)



Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

As the applicant approves, 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid (hereinafter referred to as DHNA) and compositions containing the same had been publicly known (page 2, lines 14-21, description). Thus, this compound or a composition containing the same cannot be considered as a technical feature common to claims 1 to 19.

Claims 1 to 9 relate to processes of the microbial production of DHNA. It is recognized that the technical feature thereof resides in using a microorganism.

Claims 10 to 12 and 15 to 17 relate to use of DHNA in relieving abdominal unpleasantness or controlling intestinal disorders. It is recognized that the technical feature thereof resides in applying the effect of relieving abdominal unpleasantness or controlling intestinal disorders exhibited by DHNA.

Claims 13, 14, 18 and 19 relate to the application of DHNA to the prevention and treatment of metabolic bone diseases.

The effect of relieving abdominal unpleasantness or controlling intestinal disorders is based on actions on digestive organs. According to the applicant's assertion, on the other hand, the effect of preventing and treating metabolic bone diseases is based on actions of promoting the differentiation and expression of the function of osteoblasts and inhibiting the formation of osteoclasts. That is to say, no direct relationship is found out between the effect of relieving abdominal unpleasantness or controlling intestinal disorders and the effect of preventing and treating metabolic bone diseases. Such being the case, no technical feature can be found out between them.

As discussed above, this international application has three different groups of inventions, i.e., (1) claims 1 to 9; (2) claims 10 to 12 and 15 to 17; and (3) claims 13, 14, 18 and 19 and therefore, fails to fulfill the requirement of unity of invention.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P7/42, A61K31/192,  
A61P1/04, 1/12, 1/14, 19/08

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12P7/42, A61K31/192,  
A61P1/04, 1/12, 1/14, 19/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	MEGANATHAN, R., et al, "Menaquinone (Vitamin K <sub>2</sub> ) bio-synthesis: Conversion of <i>o</i> -succinylbenzoic acid to 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid by Mycobacterium phylei enzymes" J. Bacteriol., October 1979, Vol.140, No.1, pp.92-98, 全文参照	1-6, 9 7, 8
X	WO 01/28547 A1 (MEIJI MILK PRODUCTS CO., LTD.), 2001.04.26, 請求の範囲参照 & AU 007947300 A	7-9, 13, 14, 18, 19

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.10.02

国際調査報告の発送日

29.10.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
新留 豊



4B 9639

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP 8-98677 A (明治乳業株式会社), 1996. 04. 16, 請求の範囲, 実施例1-8参照 (ファミリーなし)	9 10-12, 15-17
X Y	JP 2000-256201 A (明治乳業株式会社), 2000. 09. 19, 請求の範囲, 実施例1-4参照 (ファミリーなし)	9 10-12, 15-17
Y	KANEKO, T. and NODA, K., "Bifidogenic growth stimulator produced by propionic acid bacteria" Japanese Journal of Dairy and Food Science, 1995, Vol. 45, No. 4, pp. 83-91, Table 2-4参照	10-12, 15-17
Y	JP 2001-169749 A (日東薬品工業株式会社), 2001. 06. 26, 段落0002参照 (ファミリーなし)	10-12, 15-17
Y	JP 2000-86525 A (森下仁丹株式会社), 2000. 03. 28, 段落0003参照 (ファミリーなし)	10-12, 15-17
Y	JP 11-228424 A (共同乳業株式会社), 1999. 08. 24, 段落0002参照 (ファミリーなし)	10-12, 15-17
A	JP 10-14589 A (ユニチカ株式会社), 1998. 01. 20, 全文参照 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 9-75095 A (ユニチカ株式会社), 1997. 03. 25, 全文参照 (ファミリーなし)	1-9

## (第 I I 欄の別紙)

請求の範囲 1-19 に記載されている 1, 4-ジヒドロキシ-2-ナフトエ酸 (以下、「DHNA」という) 及びこれを含む組成物は出願人も認めるとおり公知である (明細書第 2 頁第 14-21 行)。したがって、同化合物あるいはこれを含む組成物を請求の範囲 1-19 に共通の技術的特徴とすることはできない。

請求の範囲 1-9 は、DHNA の微生物学的製造方法に関するものである。その技術的特徴は、微生物を使用している点であると認められる。

請求の範囲 10-12, 15-17 は DHNA を腹部不快症状の改善あるいは整腸に用いることに関し、その技術的特徴は DHNA が示す腹部不快症状の改善効果、あるいは整腸効果の応用であると認められる。

請求の範囲 13, 14, 18, 19 は DHNA を代謝性骨疾患の予防・治療への応用に関するものである。

ここで、腹部不快症状改善効果あるいは整腸効果は消化器系の諸器官に対する作用に基づくものであり、一方で代謝性骨疾患の予防・治療効果は、出願人の主張によれば骨芽細胞の分化と機能発現促進、及び破骨細胞の形成抑制作用に基づくものであると認められ、腹部不快症状改善効果ないし整腸効果と、代謝性骨疾患の予防・治療効果には直接的関係は認められない。したがって、両者に共通の技術的特徴は見いだせない。

以上のように、この国際出願には (1) 請求の範囲 1-9、(2) 請求の範囲 10-12、15-17 及び (3) 請求の範囲 13, 14, 18, 19 の 3 つの異なる発明が含まれており、単一性の要件を満たさない。

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 20-22 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
上記請求の範囲は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

(別紙参照)

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。  
☒ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉 (1)) (1998年7月)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**